

## EXHIBIT A

### Nouvelle méthode d'angiographie par imagerie de résonance magnétique du proton.

Auteurs : Sylvain Miraux, Eric Thiaudière, Paul Canioni, Jean Michel Franconi

Laboratoire : Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques – UMR 5536 CNRS  
Université Victor Segalen Bordeaux 2.  
146, rue Léo-Saignat 33 076 Bordeaux cedex

#### Préambule.

La description de la méthode d'angiographie placée sous ce pli a été présentée à la Société Guerbet au cours d'une réunion organisée à leur siège 16-24 rue Jean Chaptal à Aulnay-sous-Bois le 14/03/02. Un accord de secret liant la Société Guerbet et le laboratoire, représentant le CNRS et l'Université de Bordeaux 2 a été signé et est aussi placé dans ce pli.

#### TITRE de la méthode :

**C.S.A. Chemical Shift Angiography**  
(Angiographie de Déplacement Chimique, ADC)

#### Introduction : principe de la méthode

Il s'agit de la description d'une nouvelle méthode d'angiographie par résonance magnétique du proton, basée sur le déplacement chimique des protons de l'eau en présence d'agents de déplacement chimique (Dysprosium, Praséodyme, etc.... Les méthodes existantes sont basées sur la mise en place d'un contraste résultant des modification de la relaxivité de l'eau en présence d'agents de contraste modifiant les vitesses de relaxation de l'eau dans leur environnement immédiat. L'originalité de la méthode proposée réside dans l'utilisation du phénomène de déplacement chimique pour réaliser une imagerie sélective du compartiment contenant le réactif (vaisseaux). Cette idée n'a jamais été présentée dans la littérature et n'a jamais été exploitée. Ce principe d'angiographie peut s'avérer comme une méthode de choix pour le ciblage cellulaire et l'imagerie moléculaire in vivo.

#### Conditions expérimentales :

**Réactif utilisé :** Dysprosium-DOTA (concentration initiale 0.5M) fabriqué par la société Guerbet (16-24 rue Jean Chaptal à Aulnay-sous-Bois).

#### **Fantôme :**

Le fantôme est constitué d'un tube de 5 mm de diamètre contenant la solution aqueuse 2mM de Dysprosium-DOTA inséré dans un tube de 20mm de diamètre contenant de l'eau distillée. Le Dysprosium DOTA provoque dans ces conditions un déplacement de la fréquence de résonance des protons de l'eau situé dans son proche voisinage d'environ 80Hz vers les faibles valeur des constantes d'écran.

#### **Animal :**

Les mesures sur animal ont été réalisées sur un rat mâle (Sprague-Dawley, de 150 g). L'animal a été anesthésié à l'hydrate de chloral par injection intra péritonéal. La solution de dysprosium a été injectée par voie intraveineuse en bolus afin d'obtenir une concentration sanguine voisine de 2mM.

**Imagerie :** (équipement ; séquence, protocole) : Les mesures ont été réalisées sur un spectromètre imageur Biospec 47/ 50 (Bruker Médical, Ettlingen, Germany). L'émission et la réception du signal ont été obtenu à l'aide d'une antenne Helmholtz adaptée à la tête de

rat. La séquence d'imagerie mise en œuvre est de type écho de gradient 3D dotée d'une impulsion binomiale (1-3-3-1) ayant pour effet de supprimer le signal de l'eau non déplacé. Elle permet d'imager sélectivement le signal de l'eau ayant été déplacé par la proximité du dysprosium.

Les mesures concernant le fantôme ont été obtenues avec les paramètres suivants :

Temps de répétition : 33.8 ms, temps d'écho : 5.2 ms, matrice : 128 x 128 x 16 champ de vue : 6 cm x 3 cm x 3 cm.

Sur animal le champ de vue et la matrice ont été adaptés. (champ de vue 4 cm x 4 cm x 4 cm, matrice : 128 x 128 x 32). Les images ont été post traitées (0 filling, filtre Gauss sur les données brutes) à l'aide du logiciel IGOR wavemetrics.

### **Protocole :**

Certains éléments de la famille des Lanthanides sont connus pour déplacer la fréquence de résonance des protons des molécules d'eau situées dans leur voisinage immédiat. Le réactif de déplacement chimique sous forme de chélate de DOTA est administré par voie intraveineuse. Une séquence d'imagerie 2D ou 3D, fréquemment sélective imageant spécifiquement les protons déplacés par l'agent de déplacement chimique est ensuite mise en œuvre. Dans une courte période suivant l'injection, l'agent de déplacement chimique est uniquement présent dans le secteur vasculaire. L'image RMN réalise donc une cartographie spécifique de ce secteur. Le protocole expérimental comprend donc :

- une injection intraveineuse de l'agent de déplacement chimique en solution (bolus)
- La réalisation d'une séquence d'imagerie rapide 2D ou 3D sélective en fréquence pendant la diffusion du produit dans le compartiment vasculaire.

### Résultats expérimentaux :

- a) Sur fantôme : les figures 1 et 2 présentent respectivement l'image du fantôme sans et avec suppression du signal de l'eau.
  - b) Sur animal : la figure 3 montre une image de la tête de rat en absence de suppression du signal de l'eau. La figure 4 montre la même image avec suppression du signal de l'eau et après injection de la solution de dysprosium. Les carotides apparaissent alors en hyper-signal.
- Les résultats obtenus sur le fantôme montrent clairement l'intérêt de la méthode CSA pour cartographier sélectivement le compartiment contenant la solution de Dysprosium DOTA. Les résultats acquis *in vivo* sur animal montrent l'intérêt potentiel de la méthode dans le domaine de l'angiographie par résonance magnétique par IRM.

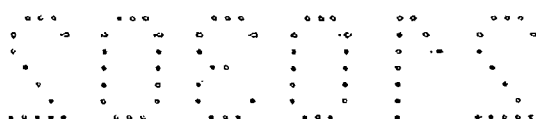
### Avantages spécifiques de la méthode CSA :

par rapport aux méthodes d'angiographie par résonance magnétiques existantes.

- Contrairement aux méthodes de temps de vol et de contraste de phase. La méthode CSA n'est pas basée sur la détection du mouvement et permet donc de voir du sang immobile ou animé d'une vitesse lente. Elle ne nécessite pas de connaissance a priori de la vitesse de circulation du sang.
- Les méthodes d'angiographie en présence d'agent de contraste utilisent l'augmentation de la relaxivité T1 (complexe de gadolinium), consécutive à une injection de produit de contraste. Ces produits de contraste ont généralement une action concomitante sur le T2 (diminution) conduisant inexorablement à une diminution de la résolution spatiale. Basée sur un principe différent (déplacement chimique), la méthode CSA devrait pouvoir limiter ce défaut.
- L'effet obtenu avec le Dysprosium DOTA peut être amplifié par l'utilisation de réactifs provoquant un déplacement chimique plus important (chélate de praséodyme). Dans ce cas la méthode CSA peut être envisagée sur des imageurs cliniques à induction statique

plus faible (1.5T). Dans le cas où le déplacement est plus important, l'utilisation rendue possible de séquences à plus petites bandes passantes pourrait permettre une augmentation significative du rapport signal sur bruit.

- En permettant une suppression ou une diminution importante du signal de certains tissus (eau), la méthode peut s'avérer très intéressante pour détecter de faibles contrastes positifs. Ces derniers seraient masqués par le signal des tissus environnants en absence de suppression du signal de l'eau. Les applications potentielles en imagerie de ciblage de l'expression des gènes et en imagerie moléculaire paraissent importantes.



# C.S.A

Images sur fantôme :

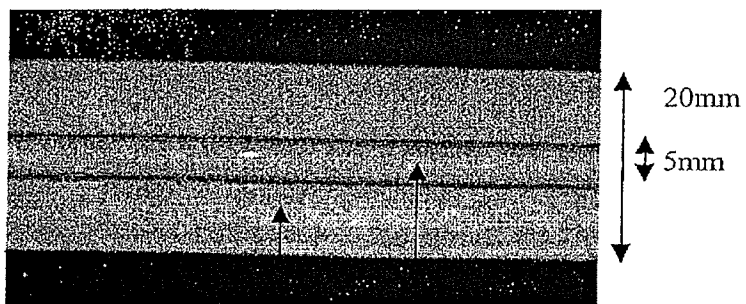


Figure 1 : Image de référence

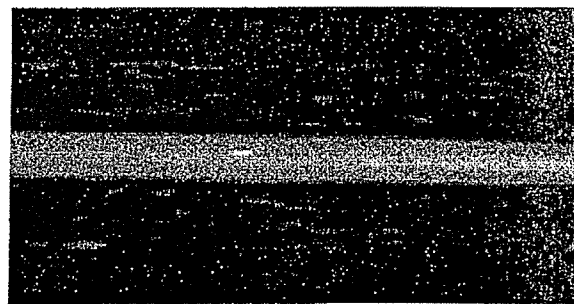


Figure 2 : Avec suppression d'eau.

Images de la tête de rat :



Figure 3 : Image de référence

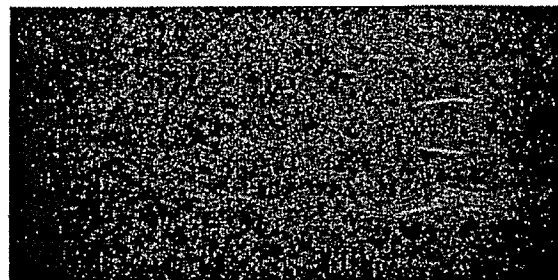


Figure 4 : Avec suppression d' $H_2O$   
et après injection de Dysprosium

## Accord de secret

Entre Guerbet  
15 rue des Vanesses 93420 Villepinte  
( BP 50400 – 95943 – Roissy CdG )  
représenté par Claire Corot, Directeur de Recherche  
d'une part

et le Centre National de la Recherche Scientifique  
dont le siège est 3 rue Michel Ange 75794 Paris  
représenté par sa Directrice Générale Geneviève Berger  
laquelle a délégué sa signature à Jeanne Jordanov,  
déléguée Aquitaine et Poitou- Charentes

ci-après CNRS  
agissant tant en son nom qu'au nom et pour le compte de l'Unité Mixte  
de Recherche 5536, résonance magnétique des systèmes biologiques,  
dirigée par le Pr Paul Canioni,  
ci-après le Laboratoire  
et l'Université Victor Segalen de Bordeaux 2  
146 rue Léo Saignat – 33076- Bordeaux  
représentée par .....

agissant tant en son nom qu'au nom et pour le compte du Laboratoire

d'autre part

étant exposé que

Guerbet et le Laboratoire qui collaborent avec d'autres équipes de recherche dans le cadre d'une action concertée incitative, dénommée GENIMAG, souhaitent maintenant étudier si une autre collaboration concernant des produits de contraste pour l'angiographie par résonance magnétique, peut être engagée entre eux et pour ce faire le Laboratoire a proposé à Guerbet d'exposer quels étaient ses travaux en ce domaine,

en conséquence de quoi, les Parties vont échanger au cours de réunions ou par écrit des Informations qui doivent rester confidentielles afin d'assurer la protection de celles-ci contre un emploi intempestif ou une divulgation non autorisée à des tiers,

les Parties s'engagent

- à ne fournir ces Informations qu'à leurs membres permanents respectivement de Guerbet et du laboratoire qui seront soumis aux dispositions du présent accord de secret
- à prendre toutes les mesures raisonnables pour éviter que ce personnel ne divulgue à des tiers, sans l'autorisation écrite de la Partie qui l'aura communiqué tout ou partie de ces Informations,
- à ne pas déposer une demande de brevet ou un autre titre de propriété industrielle incluant ces Informations sans l'autorisation écrite de l'autre Partie.

- à ne pas utiliser ces Informations que pour étudier les conditions d'une éventuelle collaboration future dans ce domaine et à ne pas les utiliser dans le but d'une exploitation directe ou indirecte sans l'autorisation écrite de l'autre Partie.

Aucune des présentes dispositions ne peut être interprétée comme concédant à Guerbet ou au Laboratoire une licence et/ou un privilège quelconque, à quelque titre que ce soit sur l'utilisation des Informations. Tout usage des Informations pour un autre objet que celui visé dans le présent accord devra donc être subordonné à la signature préalable d'un accord spécifique.

Cet engagement ne concerne pas les informations qui sont ou seront du domaine public, celles qui sont connues de la Partie les recevant avant qu'elles ne lui soient transmises, celles qu'elle développerait indépendamment ni celles qu'un tiers autorisé lui transmettrait ultérieurement.

Le présent accord de secret concernera les informations échangées pendant une année à dater du 14 Mars 2002, jour de la première réunion de Guerbet et du Laboratoire à Aulnay.

Les obligations de confidentialité prévues devront être respectées par les Parties pendant 20 ans après le 14 Mars 2002.

Toute modification à l'accord devra être constatée par écrit.

Fait en 4 exemplaires

Guerbet

Centre National  
de la Recherche Scientifique

Université Bordeaux 2

*[Signature]*

2002 4  
date date

Le Laboratoire

*[Signature]*  
*[Signature]*  
date

14 Mars 2002

date